



RUOKAVIRASTO
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

Vesihomeen tunnistusmenetelmien kehittäminen

Tiina Korkea-aho

Kalaterveyspäivä

Tutkija

Laboratorio- ja tutkimuslinja, eläintautibakteriologian ja –patologian yksikkö, villi- ja vesieläinpatologia

25.3.2021

Vesihometutkimusta 2019-2021



”Bakteerien merkitys vesihomeen esiintymisessä ja vesihomeen sekä bakteerien PCR-tunnistusmenetelmät”

- Yhteistyöhanke:
 - Ruokavirasto (Satu Viljamaa-Dirks, Tiina Korkea-aho)
 - Itä-Suomen yliopisto, Maarit Moisio, pro gradu: Kalanviljelylaitoksilla esiintyvien vesihomeiden (*Saprolegnia* spp.) tunnistaminen mikrobiologisilla ja molekyylibiologisilla menetelmillä.
 - Åbo Akademi (Tom Wiklund tutkimusryhmineen)
 - Jyväskylän yliopisto (Lotta-Riina Sundberg tutkimusryhmineen)



EUROOPAN MERI- JA KALATALOUSRAHASTO
SUOMEN TOIMINTAOHJELMA
2014-2020

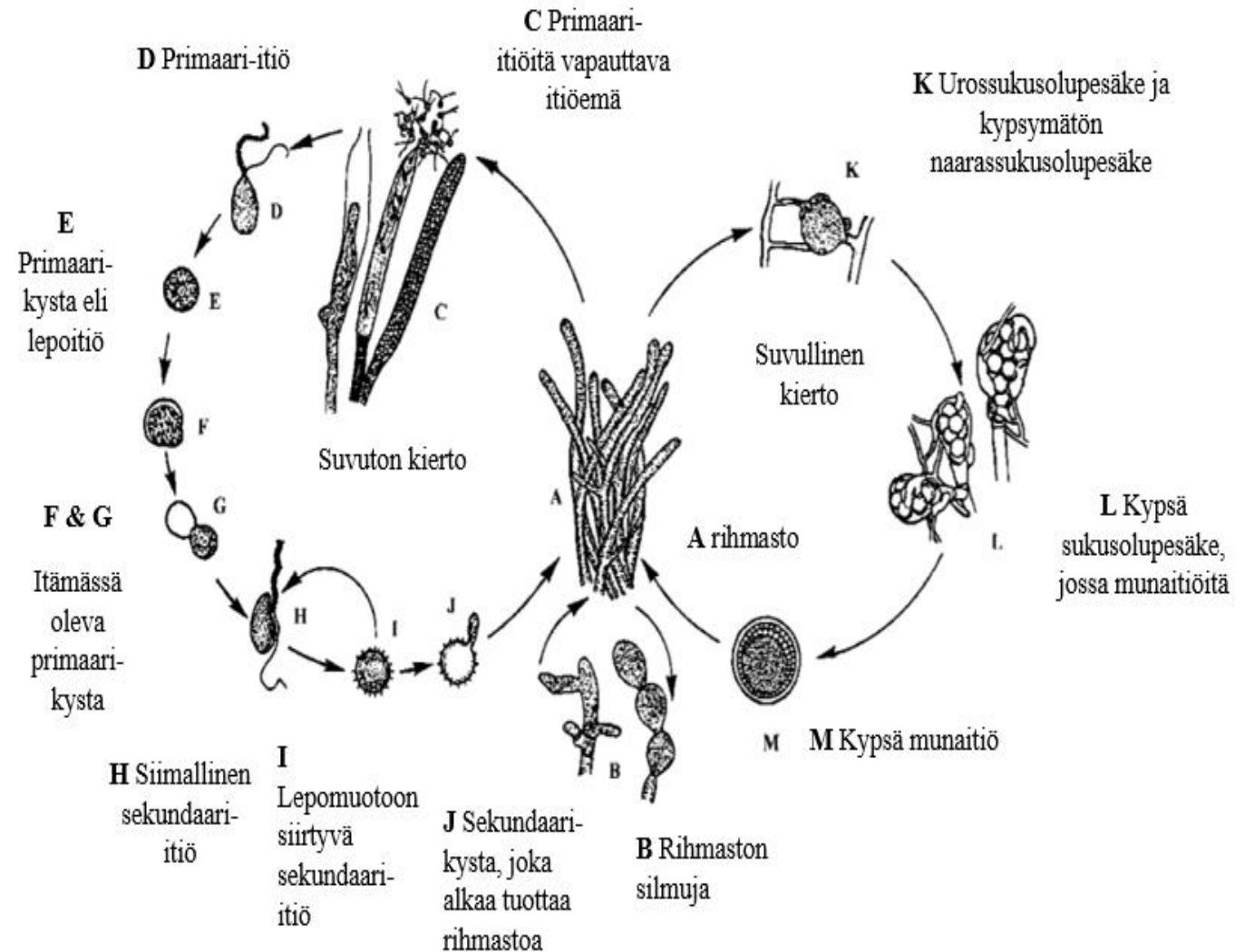


Elinkeino-, liikenne- ja
ympäristökeskus



Vesihome

- Oomykeetti eli leväsieni
- Useita vesihomelajeja makeissa vesissä ympäri maailmaa
- Lajit voivat olla vesieliöille harmittomia, saprofyyttejä tai patogeenejä
- Monivaiheinen suvuton ja suvullinen elinkierto
- Vedessä liikkuvat itiöt säilyvät ja leviävät hyvin makeissa vesissä



Kuva: Moisiö. 2021. Pro gradu; Mueller, George J. - University of Washington, Salmon Saprolegniasis, Report to Bonneville Power Administration, Contract No. 1990BP02836, Project No. 199006100, 266 electronic pages (BPA Report DOE/BP-02836-1), mukaan.

Lohikalojen vesihomeet

- Yleisimmin lohikaloista eristetään *Saprolegnia*-suvun vesihomeita -> Saprolegnioosi
- Lohikaloista eristetyt *Saprolegnia* lajit vaihtelevat jonkin verran paikan ja ajankohdan mukaan
- *Saprolegnia parasitica* yleisin lohikaloissa ympäri maailmaa, opportunisti patogeeni
- Mätimunissa yleisimmin *S. diclina* vesihomelaji, saprofyytti

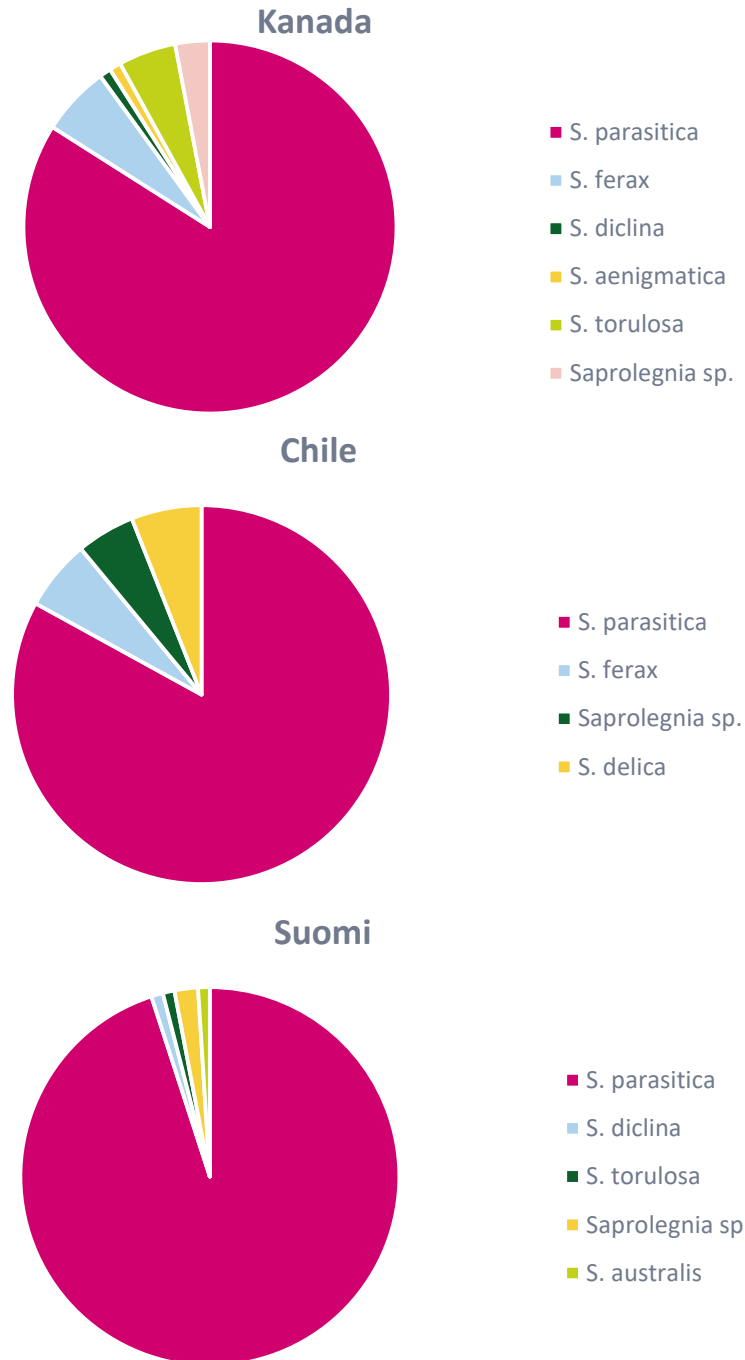
Lähteet:

Kanada: Sarowar ym. 2019. Journal of Fish Diseases.42:1745-1760.

Chile: Sandoval-Sierra ym. 2014. Aquaculture 434: 462-469.

Suomi: Engblom ym. 2019. Research report. Åbo Akademi University.

Lohikaloista eristetyt vesihomelajit (%)





Vesihome kalassa

- Kaloihin tarttuessa kasvavat hyyfinä joka näkyy kalan pinnalla pumpulimaisena vaaleana kasvustona
- Diagnoosi tehdään usein makroskooppisesti ja/tai histologisesti. Vesihomesukuja määritetään mikroskooppisesti ja lajeja sekvensoimalla -> kaloista voidaan eristää useita vesihomelajeja samassa tautitapauksessa
- Vesihomeinfektion taustalla usein altistavia tekijöitä

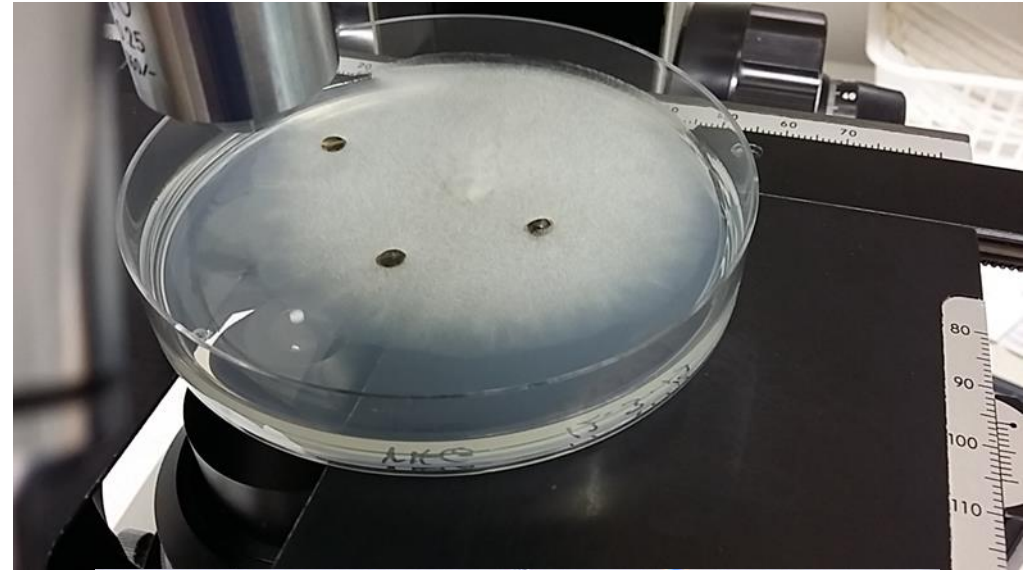


Kuvat: Satu Viljamaa-Dirks

Voiko vesihomeen tunnistaa jo ennen kuin se näkyy kalassa?



- Vesihomeen tunnistaminen vedestä mikrobiologisilla menetelmillä
- Vesinäyte elatusaineessa
 - Elatusainemalja
 - Elatusaine kuoppalevy
- Hampunsiemen
- Vesihome voidaan tunnistaa *Saprolegnia* sukuun kuuluvaksi lajiksi morfologisia rakenteita mikroskooppisesti tarkastelemalla
 - Työläs
 - Suorittaminen voi kestää useita vuorokausia



Kuva: Maarit Moisio

Saprolegnia vesihomeen tunnistaminen molekyylibiologisilla menetelmillä

- PCR (polymeraasiketjureaktio) monistaa eliölle ominaista geenituotetta -> vesihomelajin tunnistaminen
- Kvantitatiivinen reaaliaika PCR (qPCR) arvioi monistuneen geenituotteen määrää näytteessä -> vesihomelajin määrä vesinäytteessä (eDNA)
- *Saprolegnia* lajeille ei täysin spesifistä PCR tunnistusmenetelmää ole kehitetty
 - *Saprolegnia* lajit geneettisesti hyvin lähellä toisiaan, myös taksonominen luokittelu usein haasteellista
- Suunniteltiin lohikaloista eristetyistä *S. parasitica* lajien ITS –geenialueen tiedoista kohta, joka tunnistaa *S. parasitica* kannat joita esiintyy lohikaloissa
 - Tunnistaa lohikaloissa yleisesti esiintyvän *S. parasitica* kannan
 - Tunnistaa tietyissä oloissa *S. ferax* kannan



S. parasitica tunnistus vesinäytteistä eri menetelmillä



- Kalakokeen kontrolli altaissa ei *S. parasitica* vesihometta (altistus 1-2)
- Altaiden veteen lisättiin *S. parasitica* 3×10^4 itiötä/L (altistus 3-5)
- Vesinäytteet kontrolli (n = 4) ja vesihome (n = 6) altaista päivinä 0, 2, 6 ja 14
- Millään menetelmällä ei väärää positiivisia (spesifisyys 100 %)
- Menetelmien sensitiivisyys
 - Elatusainemalja 29 %
 - Elatusainekuoppalevy 25 %
 - Hampunsiemen 0 %
 - PCR 96 %

Altistus	Päivät altistuksesta	Elatusaine-malja	Elatusainekuoppalevy	Hampunsiemen	PCR
Kontrolli 1	0	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	14	-	-	-	-
Kontrolli 2	0	-	-	-	-
	2	-	-	-	-
	6	-	-	-	-
	14	-	-	-	-
Vesihome altistus 3	0	+	-/+	-	+
	2	-	-/+	-	+
	6	-	-	-	+
	14	-	-	-	+
Vesihome altistus 4	0	-/+	-/+	-	+
	2	-	-	-	+
	6	-	-	-	+
	14	-	-/+	-	-/+
Vesihome altistus 5	0	-/+	-/+	-	+
	2	-/+	-/+	-	+
	6	-	-	-	+
	14	+	-	-	+



Lohikalojen *S. parasitica* vesihomeen tunnistaminen kalanviljelylaitosten vedestä

- *S. parasitica* määrät erilaisten kalanviljelylaitosten kala-altaiden vesinäytteissä?
- Näytteitä keväällä/kesällä 2020
- Neljältä eri laitokselta, viisi näytteenottokertaa, sekä Kallaveden Savilahdesta, jossa ei läheisyydessä kalanviljelylaitoksia
- Jokaiselta laitokselta tutkittiin vesinäytteet kolmesta kala-altaasta, viisi kalaa/allas, silmämääräinen arvio vesihomeisten kalojen määrästä altaissa



Kuva: Maarit Moisio

S. parasitica tunnistaminen ja määrät kalanviljelylaitoksilla



Vesihomeen suhteelliset määrät eri menetelmillä korreloivat ($R^2= 0,924$)

Kalan viljely laitos	Pvm	Veden lämpötila (°C)	Kalalaji	Kalojen ikä (vuotta)	Allas	Kalatiheys kg/m ³	Vesihomeisten kalojen arvioitu osuus altaassa	Elatusaine Saprolegnia itiöitä/L vettä	Saprolegnia itiöiden DNA määrä ng/L vettä
1	6.5.2020	5,8	järvilohi	2	1a	6	50 %	>10000±0	37231±7788
					1b	E.T	20 %	9410±159	1603±805
					1c	0,5	0 %	35±60	4±11
1	3.6.2020	12,6	järvilohi	2	1d	0,47	0 %	347±120	42±0
					1e	0,29	1 %	1319±262	527±19
					1f	0,43	5 %	1250±276	673±54
2	18.5.2020	16,3	kirjolohi	0	2a	32	0 %	1007±262	152±42
					2b	36	0 %	1806±159	793±185
					2c	18	0 %	1458±853	124±46
3	25.5.2020	12,7	taimen	1	3a	4,4	0 %	0±0	5±13
					3b	1,2	0 %	0±0	0±0
					3c	7,4	0 %	0±0	0±0
4	27.5.2020	14	merilohi	1	4a	4,3	10 %	5278±481	821±86
					4b	5,1	80 %	7813±276	1423±676
					4c	0,5	0 %	174±159	5±8
Savi-lahti	1.6.2020	15,8						69±60	2±5

Huomionarvoista vesihomeen määrän arvioinnissa vesinäytteissä



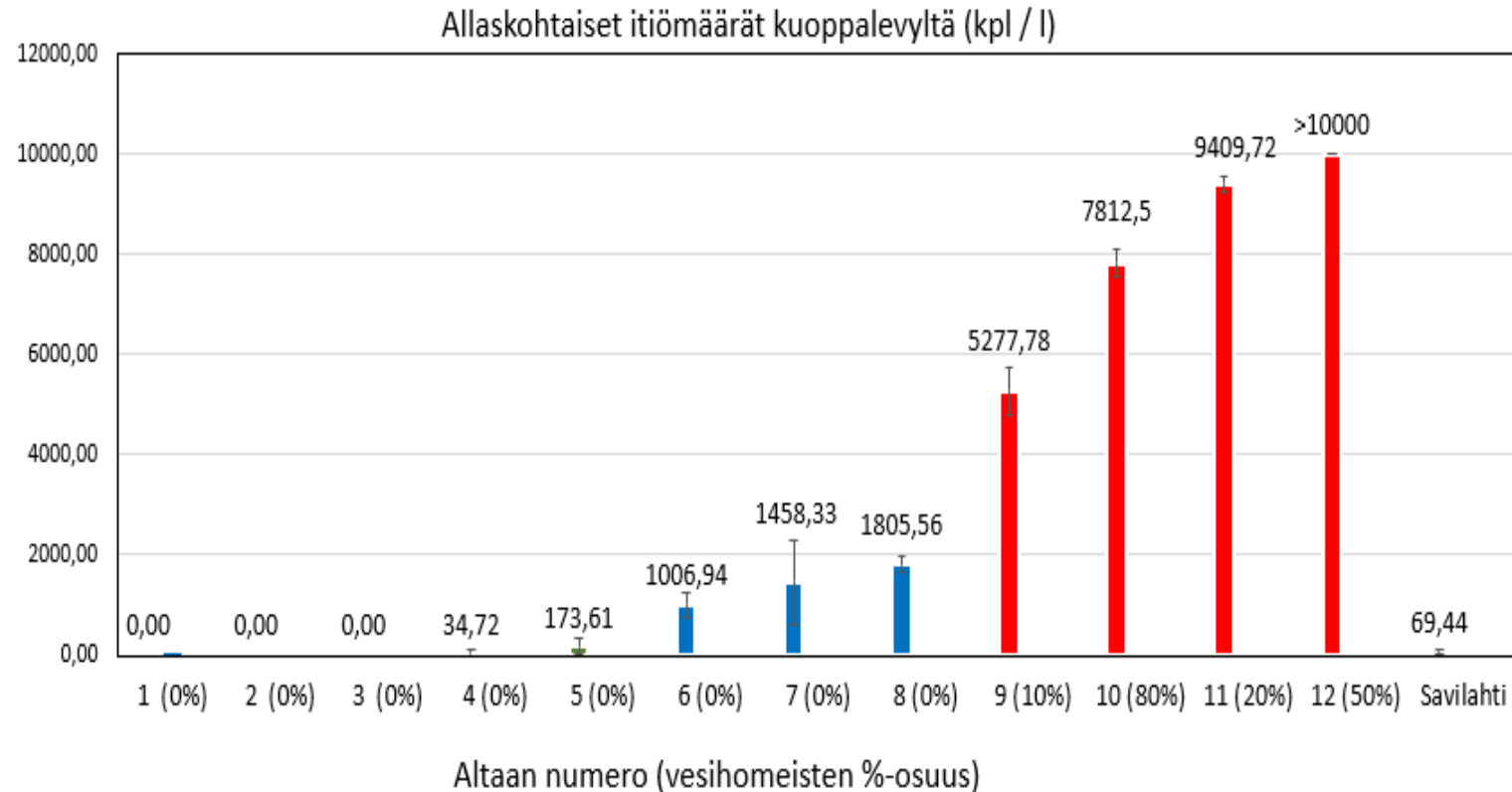
- PCR-menetelmä sensitiivinen tunnistamaan lohikaloista eristetyt *S. parasitica* vesihomeen myös vedestä
- PCR-menetelmä tunnistaa myös kuolleet itiöt
- Lisää tutkimusta tarvitaan arvioimaan veden itiömäärän merkitystä kalojen vesihomeinfektioon, niin että riskitekijöiden merkitys (lämpötila, kalalaji jne.) myös huomioidaan
- Luotettava itiömäärien arviointi tärkeää arvioitaessa infektiopainetta, kylvetysten ajankohtaa ja tehokkuutta kala-altaissa





S. Parasitica kalanviljelylaitoksilla

- Yksi vesihomeinen kala voi erittää yli 100 000 vesihomeitiötä minuutissa
 - Vesihomeisten kalojen poisto altaasta (varsinkin alkuvaiheessa)
 - Vesihomeisten kalojen siirtelyä tulee välttää





RUOKAVIRASTO
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

Kiitos mielenkiinnosta!

